西藏地区不同牧草体外发酵特性研究[1]

李　斌[1]　陈　亮[2*]　巴桑珠扎[1]　奥斯曼[1]　周传社[2,3**]

（1.西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所，拉萨 850000；2.中国科学院亚热带农业生态研究所，亚热带农业生态过程重点实验室，湖南省畜禽健康养殖工程技术中心，农业部中南动物营养与饲料科学观测试验站，长沙 410125；3.湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128）

摘　要：本文旨在利用体外产气法评定西藏地区不同牧草营养价值。选取西藏地区 5 种常见牧草，通过单因素试验设计，利用体外产气法评定 5 种牧草体外发酵 48 h 累积产气量、理论最大产气量（V_f）、初始产气速率（FRD_0）、达到最大产气量一半时所需时间（$t_{0.5}$）、体外干物质消失率(IVDMD)、体外中性洗涤纤维消失率（IVNDFD）、pH、氨态氮（NH_3-N）浓度以及挥发性脂肪酸（VFA）产量。结果表明，体外发酵 48 h 后，苇状羊茅体外 48 h 累积产气量、V_f、FRD_0、IVDMD 及甲烷（CH_4）、乙酸、丙酸、丁酸和总 VFA 产量均显著高于其他 4 种牧草($P<0.05$)，但其体外发酵 pH 及乙酸/丙酸显著低于其他 4 种牧草($P<0.05$)；紫花苜蓿体外 NH_3-N 浓度最高，显著高于其他 4 种牧草($P<0.05$)。综上分析，苇状羊茅体外发酵效果最佳，与其他试验牧草相比，更容易被瘤胃微生物降解利用。

关键词：西藏；牧草；体外发酵

中图分类号：S816.5　　　　文献标识码：　　　　文章编号：

草地畜牧业一直是西藏的重要经济基础，几十年来一直占农业生产总值的 60%左右[1]。近年来，随着西藏人口增加和畜牧业的进一步发展，传统的单纯依赖天然草地和以作物秸秆为主的畜牧业生产模式已不能满足牲畜对饲草的要求[2-3]。而随着家畜数量的不断增加，导致草畜之间矛盾日益突出，生态环境不断恶化，严重影响西藏地区畜牧生产系统的平衡、稳定与发展[4]。因此，大规模人工种植适合西藏特殊生长环境的牧草，对满足西藏地区畜牧业生产对牧草的需求、维持西藏地区生态平衡稳定、促进藏区经济发展等都具有重要意义。

收稿日期：2015-12-11

基金项目：国家自然科学基金项目（31372342）；中国科学院科技服务网络计划（KFJ-EW-STS-071）

作者简介：李　斌（1989-），男，黑龙江牡丹江人，硕士，从事西藏黄牛改良育种研究。E-mail：276504821@qq.com

*同等贡献作者

**通信作者：周传社，研究员，硕士生导师，E-mail：　zcs@isa.ac.cn

近年来，学者对西藏地区牧草以及作物秸秆的研究较多。曲广鹏等[5]通过对西藏农区牧草和饲草作物引种试验表明，燕麦、多花黑麦草、饲用玉米、绿麦、红苋 5 种牧草适合在西藏农区及河谷地区种植，但其并未对这 5 种牧草进行相关的营养价值评价。张中岳[6]对西藏地区 28 种牧草的营养价值及瘤胃降解特性进行了评价，为进一步研究西藏牧草提供了宝贵的基础数据。张吉等[7]研究了添加剂对西藏燕麦和箭筈豌豆混合青贮品质的影响，结果表明添加糖蜜能显著提高混合青贮的品质。孙肖慧等[8]和李君风等[9]通过向西藏地区燕麦和紫花苜蓿混合青贮中添加 4%糖蜜或 3.5%乙醇或 0.4%乙酸获得优质青贮饲料。赵庆杰等[10]通过向西藏青稞秸秆和多年生黑麦草混合青贮中添加糖蜜和乳酸菌显著提高了混合青贮发酵品质。原现军[11]对西藏作物秸秆与牧草混合青贮进行了研究，均有效地提高了混合青贮的发酵品质。综上，目前对西藏地区牧草及作物秸秆的研究多数集中在西藏地区青贮料的研究领域，而对牧草干草瘤胃降解特性研究鲜有报道。因此，本试验通过利用体外产气技术，对西藏拉萨地区常见牧草的瘤胃体外发酵参数进行研究，并通过试验数据分析，筛选出易被瘤胃微生物降解利用的牧草，以期为西藏地区农牧业发展提供科学依据。

1　材料与方法

1. 1　试验材料

1.1.1　样品采集及处理

试验牧草（紫花苜蓿、黑麦草、芦苇、苇状羊茅、燕麦）采集于西藏自治区贡嘎县岗堆镇吉纳村草场，牧草经 65 ℃烘干 24 h，粉碎经 1 mm 孔径筛后备用。

1.1.2　试验动物及饲粮

试验供体奶牛为健康状况良好、体重（500±50） kg的3头装有永久瘤胃瘘管的荷斯坦奶牛，试验奶牛由湖南省长沙市望城区白若铺镇胜和奶牛养殖基地提供。试验期间，奶牛饲粮参照NRC[12]标准配制。基础饲粮由水稻秸秆和精料补充料组成，饲粮精粗比为40:60。饲粮组成及营养水平依照Hall等[13]，使用Fibretherm FT12全自动纤维仪(gerhardt analytical

systems, Germany)测定中性洗涤纤维（neutral detergent fiber, NDF）和酸性洗涤纤维（acid detergent fiber, ADF）含量；按照杨胜[14]确定的常规方法测定干物质（dry matter, DM）、粗蛋白质（crude protein, CP）含量，利用ICP-AES法测定钙（Ca）、磷（P）含量[15]。试验饲粮组成及营养水平见表1。

表 1　试验饲粮组成及营养水平(干物质基础)

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diet (DM basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
水稻秸秆 Rice straw	40.00
玉米 Corn	39.60
豆粕 Soybean meal	19.10
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.00
石粉 Limestone	0.30
预混料 Premix[1)]	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
干物质 Dry matter	70.88
粗蛋白质 Crude protein	17.98
酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	42.98
中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	23.72
钙 Ca	0.72
磷 P	0.35
泌乳净能 Net energy for lactating cow/（MJ/kg）	7.70

1) 每千克预混料含有 Per kilogram premix contained：VA≥2 000 000 IU，VD≥300 000 IU，VE≥3 000 IU，Cu≥3 500 mg，Fe≥10 000 mg，Zn≥10 000 mg，Mn≥9 000 mg，Mg≥9 800 mg，I≥90 mg，Se≥40 mg，Co≥30 mg。

2) 泌乳净能为计算值[16]，其余为实测值。Net energy for lactating cow was a calculated value[16], while the others were measured values.

1.2　试验方法

1.2.1　牧草营养成分分析方法

经处理后的粗饲料利用杨胜[14]提供的饲料分析方法分别对其进行 DM、粗脂肪（EE）、

粗纤维（CF）、NDF、ADF 等营养成分含量进行测定；粗灰分（ash）按 GB/T 6438-2007 方法进行测定（表 2）。

表 2　牧草营养价值

Table 2　Nutrient values of pastures　　%

项目 Items	干物质 DM	粗脂肪 EE	粗纤维 CF	灰分 Ash	中性洗涤纤维 NDF	酸性洗涤纤维 ADF
紫花苜蓿 Alfalfa	90.38	5.13	45.79	5.61	67.04	47.30
黑麦草 Perennial ryegrass	92.29	9.55	23.94	15.21	57.11	33.45
芦苇 Phragmites	92.55	4.02	33.85	12.89	70.14	48.04
苇状羊茅 Tall fescue	90.59	1.41	19.49	8.75	52.25	33.15
燕麦 Oat	90.04	5.35	30.61	7.84	68.74	40.92

1.2.2　体外发酵液配制

按照 Menke 等[17]提供的方法配制厌氧缓冲液。于晨饲前采集 3 头瘘管牛瘤胃内容物，用 8 层纱布过滤，滤液等体积混合后装入事先充满二氧化碳（CO_2）并预热到 39.5 ℃的保温瓶中，迅速带回实验室，与事先在 39.5 ℃恒温水浴锅中预热的厌氧缓冲液混合（$V_{缓冲液}$：$V_{瘤胃液}$=9:1)。并持续通入 CO_2。

1.2.3　体外培养

称取（0.500 0±0.000 3） g 粉碎的牧草秆于发酵瓶中，置于 39.5 ℃恒温培养箱中预热，向发酵瓶中加入发酵液前，向瓶中通入 CO_2 1 min，随后加入 50 mL 发酵液，并持续通入 CO_2，立即加上瓶塞瓶盖，并使用针头放气，使内外压强保持一致，然后迅速放回恒温培养箱，39.5 ℃恒温静止培养 48 h。每种发酵底物设置 12、24、48 h 3 个采样时间点重复，每个采样时间点设置 3 个样品重复。

1.2.4　体外发酵总产气量测定

体外发酵产气量按王祚等[18]提供方法进行测定。

利用 Wang 等[19-20]提出的 LE 模型对累积产气量数据进行拟合：

$$V = V_f * \frac{1-\exp(d-t*k)}{1+\exp(b-t*k)}$$

$$FRD_0 = \frac{k}{1+\exp(b)}$$

$$t_{0.5} = \frac{\ln(2+\exp(b))}{k}$$

其中：V 表示 t 时间点底物的产气量（mL）；V_f表示理论最大产气量（mL）；k 表示产气分率；b 和 d 是曲线的形状指标，b>0 表示曲线为 s 形，b<0 则表示曲线非 s 形。FRD_0 表示初始产气速率（<12 h），$t_{0.5}$表示达到最大产气量一半所需时间。

1.2.5　体外发酵相关参数测定

1.2.5.1　甲烷测定及计算方法

分别于体外发酵中的 12、24、48 h 取出发酵瓶，利用注射器从发酵瓶中抽取 5 mL 气体，注入事先已抽真空的集气瓶中，然后再注入 25 mL 高纯度氮气（N_2）。利用安捷伦 7890A 型气相色谱仪（USA）进行测量，载气使用高纯 N_2，总压力 130 kPa，总流量 30.2 mL/min，柱流量 1.7 mL/min，线速度 39.8 cm/s，分流比 15，吹扫流量 3 mL/min，循环流量 8 mL/min，氢气（H_2）流量 40 mL/min，空气流量 400 mL/min[21]。甲烷产量计算公式为：

$$V_{CH_4} = 6*V_t*C$$

其中：6 是稀释倍数，V_t指在发酵时间 t 时，发酵瓶中气体总体积(mL)；C 指在发酵时间 t 时，所测甲烷浓度(%)；V_{CH_4} 指在发酵时间 t 时，所生产甲烷体积(mL)。

1.2.5.2　pH 测定方法

分别于体外发酵中的 12、24、48 h 取出发酵瓶，发酵液经 400 目尼龙布过滤，取 5 mL 滤液，利用 pH 计（REX PHS-3C，上海仪器设备厂）立即测定滤液 pH。

1.2.5.3　体外发酵氨态氮（NH_3-N）浓度

分别于体外发酵中的 12、24、48 h 取出发酵瓶，发酵液经 400 目尼龙布过滤，取 4 mL

滤液，分装到 2 个容积为 2 mL 离心管中，放入-20 ℃冰箱保存，分别用于测量 NH_3-N 浓度。利用冯宗慈等[22]改进的比色法，使用紫外/可见分光光度计-UV-2450 进行测定。

1.2.5.4　体外发酵挥发性脂肪酸（VFA）含量

分别于体外发酵中的 12、24、48 h 取出发酵瓶，每瓶取 2 mL 发酵液，经 24 100×*g* 离心 15 min 后，取 1.5 mL 上清液于 2 mL 离心管中，并加入 0.15 mL 25%偏磷酸，放入-20 ℃冰箱保存。样品在常温条件下解冻，24 100×*g* 和 4 ℃条件下离心 10 min，取 0.6 mL 装与上机瓶中，利用气相色谱仪（安捷伦 7890A, 美国）对样品中 VFA 含量进行测定[23]。

1.2.5.5　体外干物质消失率(IVDMD)测定及计算方法

分别于体外发酵中的 12、24、48 h 取出发酵瓶，发酵液经 400 目尼龙布过滤，将过滤后的残渣全部转移至石英坩埚中并用热蒸馏水反复冲洗，置于 105 ℃烘箱中烘干 8 h 以测定剩余干物质，并计算其消失率：

$$IVDMD=\left[1-\left(M_2/M_1\right)\right]*100\%$$

其中：M_1 为发酵前干物质质量；M_2 为发酵后干物质剩余质量。

1.2.5.6　体外中性洗涤纤维消失率（IVNDFD）测定及计算方法

测定过干物质消失率后的剩余干物质，按照 Hall 等[13]提供的方法进行测定，并计算 IVNDFD：

$$IVNDFD=\left[1-\left(m_2/m_1\right)\right]*100\% \qquad (6)$$

其中：m_1 为发酵前发酵底物中 NDF 质量；m_2 为发酵后剩余干物资中 NDF 质量。

1.3　数据分析

试验数据采用 SAS 8.2 的 MIXED 过程统计，统计差异显著性定义为 $P<0.05$。

2　结　果

2.1　不同牧草对体外产气量的影响

不同牧草体外发酵产气量如图 1。由图 1 可知，5 种牧草体外发酵产气量在发酵初期 1~4

h 均无明显差异，第 4 h 后，各牧草体外产气量开始逐渐上升，且由各曲线斜率可知，5 种牧草体外发酵产气速率也逐渐增大；在第 12~24 h，各曲线斜率达到最大，体外发酵产气速率到达最大值。体外发酵 36 h 以后，5 种牧草曲线逐渐斜率变小，产气速率逐渐趋于稳定。同时由图 1 可知，苇状羊茅体外产气量在第 4 h 后始终高于其他牧草体外产气量。体外发酵 24 和 48 h 时，苇状羊茅体外产气量分别为 72.16、88.15 mL，均高于其他 4 种牧草；芦苇体外产气最低，分别为 35.44、48.84 mL，均低于其他牧草体外产气量。5 种牧草体外发酵 48 h 体外累积产气量按苇状羊茅、燕麦、黑麦草、紫花苜蓿、芦苇的顺序依次降低。

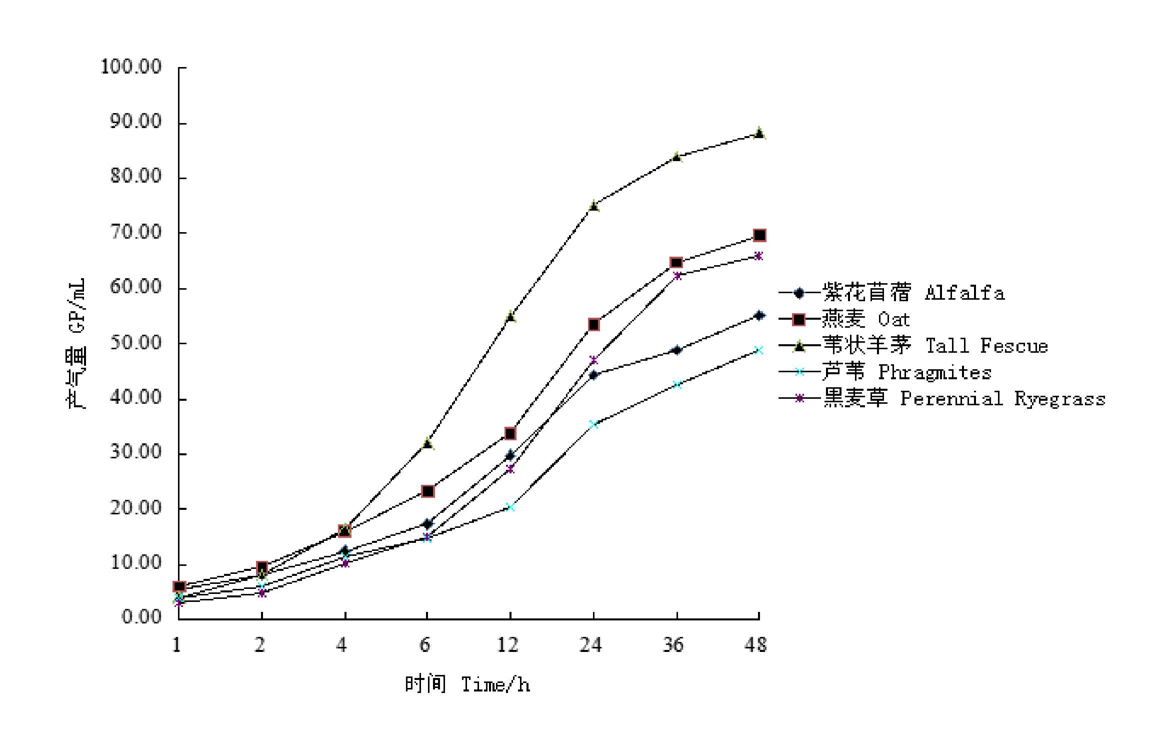


图 1 不同牧草对体外产气量的影响

Fig.1 Effects of different pastures on *in vitro* gas production

2.2 不同牧草对体外发酵产气参数及甲烷（CH_4）产量的影响

不同牧草对体外发酵产气参数及 CH_4 产量的影响如表 3 所示。由表 3 可知，5 种牧草体外理论最大产气量（V_f）、初始产气速率（FRD_0）和 CH_4 产量均以苇状羊茅最高，均显著高

于其他 4 种牧草（P<0.05）。FRD_0 越高，意味着对应的达到最大产气量一半时所需时间（$t_{0.5}$）越短。而 $t_{0.5}$ 则以苇状羊茅和紫花苜蓿最低，两者之间没有显著差异（P＞0.05），但均显著低于其余 3 种牧草（P<0.05）。

表 3　不同牧草对体外发酵产气参数和 CH_4 产量的影响

Table 2　Effects of different pastures on *in vitro* gas production parameters and CH_4 production

项目 Items	理论最大产气量 V_f/mL	初始产气速率 FRD_0/（10^{-2} mL/h）	达到最大产气量一半时所需时间 $t_{0.5}$/h	甲烷 CH_4/（mL/g）
紫花苜蓿 Alfalfa	58.54±1.69[d]	4.26±0.01[b]	11.20±1.49[c]	17.54±1.36[b]
芦苇 Phragmites	56.36±5.75[d]	3.25±0.01[c]	18.92±2.06[a]	10.41±1.25[d]
苇状羊茅 Tall fescue	88.42±1.74[a]	7.26±0.01[a]	8.78±2.07[c]	20.63±1.98[a]
燕麦 Oat	77.78±2.47[b]	4.70±0.01[b]	14.73±0.44[b]	17.21±1.56[b]
黑麦草 Perennial ryegrass	71.68±1.22[c]	3.07±0.01[c]	16.69±1.93[ab]	15.59±1.43[c]

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），相同或无字母表示差异不显著（P>0.05）。下表同。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). The same as below.

2.3　不同牧草对 IVDMD 和 IVNDFD 的影响

不同牧草对 IVDMD 以及 IVNDFD 的影响如表 4 所示。5 种牧草之间 IVDMD 均存在显著差异（P<0.05），其中苇状羊茅 IVDMD 最高（56.25%），显著高于其他 4 种牧草（P<0.05）。5 种牧草 IVDMD 大小按苇状羊茅、黑麦草、燕麦、紫花苜蓿、芦苇的顺序依次显著降低（P<0.05）。对于 IVNDFD，苇状羊茅 IVNDFD 显著高于紫花苜蓿和芦苇（P<0.05），与燕麦和黑麦草无显著差异（P>0.05）；紫花苜蓿 IVNDFD 最低（14.03%），显著低于其他 4 种牧草（P<0.05）。

表 4　不同牧草对 IVDMD 和 IVNDFD 的影响

Table 4 Effects of different pastures on IVDMD and IVNDFD %

项目 Items	体外干物质消失率 IVDMD	体外中性洗涤纤维消失率 IVNDFD
紫花苜蓿 Alfalfa	30.69±2.01[d]	14.03±1.03[d]
芦苇 Phragmites	25.58±2.31[e]	19.13±2.31[c]
苇状羊茅 Tall fescue	56.25±1.52[a]	39.86±2.61[ab]
燕麦 Oat	41.04±1.63[c]	35.55±2.01[b]
黑麦草 Perennial ryegrass	51.38±1.54[b]	40.29±2.36[a]

2.4 不同牧草对体外发酵 pH 和 NH_3-N 浓度的影响

不同牧草对体外发酵 pH 和 NH_3-N 浓度影响见表 5。5 种牧草以紫花苜蓿体外发酵 pH 最高，其次为芦苇和燕麦，三者之间无显著差异（$P>0.05$），但均显著高于苇状羊茅和黑麦草（$P<0.05$）；5 种牧草以苇状羊茅体外发酵 pH 最低（6.32），显著低于其他 4 种牧草（$P<0.05$）。对于体外发酵液中 NH_3-N 浓度，5 种牧草相互之间存在显著差异（$P<0.05$），紫花苜蓿 NH_3-N 浓度最高（18.64 mg/dL），显著高于其他 4 种牧草（$P<0.05$）；苇状羊茅 NH_3-N 浓度最低（6.26 mg/dL）。5 种牧草体外发酵 48 h 后，发酵液中 NH_3-N 浓度按紫花苜蓿、燕麦、黑麦草、芦苇、苇状羊茅的顺序显著降低。

表 5 不同牧草对体外发酵 pH 及 NH_3-N 浓度的影响

Table 5 Effects of different pasture on *in vitro* fermentation pH and NH_3-N concentration

项目 Items	pH	氨态氮 NH_3-N/（mg/dL）
紫花苜蓿 Alfalfa	6.59±0.12[a]	18.64±1.02[a]
芦苇 Phragmites	6.56±0.32[a]	10.11±1.09[d]
苇状羊茅 Tall fescue	6.32±0.25[c]	6.26±0.65[e]
燕麦 Oat	6.56±0.21[a]	15.76±1.28[b]
黑麦草 Perennial ryegrass	6.47±0.23[b]	13.84±1.96[c]

2.5 不同牧草对体外发酵 VFA 产量的影响

不同牧草对体外发酵 VFA 产量的影响如表 6 所示。5 种牧草中，以苇状羊茅体外乙酸、丙酸、丁酸和总 VFA 产量最高，均显著高于其他 4 种牧草（$P<0.05$）；而乙酸/丙酸则以苇状羊茅最低，显著低于其余 4 种牧草（$P<0.05$）。

表 6 不同牧草对体外发酵 VFA 产量的影响

Table 6 Effects of different pastures on *in vitro* VFA production

项目 Items	乙酸 Acetic acid/（mmol/L）	丙酸 Propanoic acid/（mmol/L）	丁酸 Butyric acid/（mmol/L）	总挥发性脂肪酸 Total VFA/（mmol/L）	乙酸/丙酸 A/P
紫花苜蓿 Alfalfa	21.57±2.35^{b}	6.57±0.56^{bc}	1.77±0.08^{c}	30.99±2.30^{b}	3.28±0.65^{a}
芦苇 Phragmites	17.61±2.31^{d}	5.52±0.52^{c}	1.81±0.10^{c}	25.48±2.51^{c}	3.27±0.41^{a}
苇状羊茅 Tall fescue	27.85±2.96^{a}	13.60±0.96^{a}	3.67±0.15^{a}	46.02±3.01^{a}	2.09±0.36^{c}
燕麦 Oat	18.61±1.32^{c}	6.21±0.87^{c}	2.51±0.06^{b}	29.82±3.12^{bc}	2.98±0.12^{b}
黑麦草 Perennial ryegrass	22.80±1.30^{b}	7.76±0.23^{b}	2.36±0.17^{b}	33.74±2.65^{b}	2.97±0.21^{b}

3 讨 论

3.1 不同牧草对体外产气量的影响

研究表明，5 种牧草之间体外产气量均存在差异，以苇状羊茅 48 h 累积产气量最高，这可能是由于不同牧草所含的碳水化合物不同所造成的。牧草体外发酵产气来源主要是碳水化合物，虽然牧草所含 CP 在体外发酵时也会产生一部分气体，但整个体外发酵过程中，CP 对体外产气量的贡献量远低于碳水化合物[24]，Cone 等[25]对酪蛋白和淀粉的体外发酵研究发现，发酵 72 h 后蛋白质发酵的产气量仅为碳水化合物的 30%。此外，本试验所用 5 种牧草除紫花苜蓿为豆科外，其他 4 种牧草均为禾本科牧草；种属不同可能也是粗饲料体外产气量存在差异的原因之一。有研究报道指出不同类型粗饲料体外酵产气特性有较大差异，通常情况下，种内差异较小，种间差异较大[24]。本试验结果表明，粗饲料体外发酵在 6~24 h 时，体外产气量均急剧上升，36 h 以后趋于平缓，此结果与刘书杰[26]已报道结果有差异。刘书杰[26]利用阉割牦牛对青海高原天然牧草营养价值进行评价时报道，天然牧草在 12~48 h 产气量的平均值急剧上升，48 h 以后平均产气量的增加逐渐平缓。两者之间差异可能是由于发酵底物不同和发酵液成分不同造成的。

3.2 不同牧草对体外发酵产气参数及 CH_4 产量的影响

在体外发酵过程中，发酵底物为瘤胃微生物所利用的程度可以通过体外发酵累积产气量来反映[27]。本试验中，各牧草之间理论最大产气量存在明显差异，这可能是由于不同牧草可溶性非结构性碳水化合物与 CP 的比例不同所造成的。汤少勋等[24]研究报道，当可溶性非结构性碳水化合物与 CP 之间的比例越大时，理论最大产气量越高；比例越小时，理论最大产量越低，亦即随着牧草中非结构性碳水化合物含量的增加，体外发酵增强。高巍等[28]研究表明，青贮玉米秸秆及苜蓿干草中性洗涤可溶物（DNS）的产气量占饲草累积产气量的绝大部分。

FRD_0 表示体外发酵 12 h 之前产气速率，$t_{0.5}$ 表示体外累积产气量达到最大值一半时所需时间，通常情况下，FRD_0 越大，$t_{0.5}$ 越小[29]。在本试验中，牧草中以苇状羊茅 FRD_0 最大，其 $t_{0.5}$ 也最小。Muck 等[30]研究报道，体外发酵过程中 65%~70%产气量在发酵初期 9~10 h 内产生，而本试验中，除苇状羊茅外，其余 4 种牧草体外发酵产气量达到总产气量 50%时所需时间为 10~19 h 之间，明显高于 Muck 等[30]所报道的结论，可能是由于两者体外培养方式以及发酵底物的不同而导致 FRD_0 和 $t_{0.5}$ 上存在差异。

反刍动物瘤胃中 CH_4 是由瘤胃中碳水化合物经瘤胃微生物厌氧发酵所生成的[31]。在瘤胃代谢过程中，瘤胃中 CH_4 的生成是瘤胃发酵能量损失的主要原因之一，据报道，6%~15%的饲料能量以 CH_4 的形式散失[32]。瘤胃中 CH_4 的生成与饲粮中 CP、ADF、NDF、无氮浸出物（NFE）以及 IVDMD 相关[33]。在本研究中，不同牧草之间体外发酵 CH_4 产量存在显著差异，其中，以苇状羊茅体外 CH_4 产量最高，与刘树军等[34]研究结果一致，这种差异可能是不同粗饲料中可发酵的碳水化合物类型以及与 CH_4 生成相关的牧草成分含量的不同所致[35]。有报道指出牧草纤维物质含量是影响 CH_4 产量的一个重要因素[36]，这可能是由于富含纤维物质的饲料能促进一些纤维分解菌和 CH_4 合成菌的共生引起的，这类微生物可以偶联碳水化合物的降解产物，利用氢气还原 CO_2 以合成 CH_4 [37]。

3.3　不同牧草对 IVDMD 和 IVNDFD 的影响

IVDMD 和 IVNDFD 是体现瘤胃发酵过程中粗饲料利用率的重要指标[18]。粗饲料在瘤胃中的降解实际上是微生物以及微生物分泌的酶相互作用的结果，而降解率的高低与营养物质的结构、微生物对底物的附着能力以及微生物分泌酶的催化能力有关[6]。在本试验中，不同牧草 IVDMD 存在明显差异，其中，牧草以苇状羊茅 IVDMD 最高。这中差异可能是由于牧草富含非结构性碳水化合物以及可消化的有机物含量不同造成的，苇状羊茅非结构性碳水化合物和可消化有机物含量高于其他牧草，此种结果也暗示苇状羊茅很容易被瘤胃微生物降解利用；而芦苇的 IVDMD 最低，可能由于其结构不利用微生物的附着及生长所造成的。

由于 NDF 的降解性影响动物的生长性能，并且牧草在反刍动物瘤胃中的降解率差异比较大，因此，牧草中 NDF 的降解率是评定牧草品质的一个重要指标。本研究中，牧草以苇状羊茅 IVNDFD 最高，而其他牧草的 IVNDFD 也存在明显差异，造成这种差异的原因可能与微生物与底物的吸附能力以及底物的结构有关，相对于其他牧草，苇状羊茅可能更容易吸附纤维降解菌。Fernando 等[38]报道细菌与底物的吸附能力是影响底物消化率的重要因子，徐俊等[39]研究报道，苜蓿茎被瘤胃微生物降解的速率及程度受其组织结构及组分影响，同时其指出微生物对植物组织的吸附方式的不一致性也可能是造成不同底物纤维降解率不同的原因之一。

3.4 不同牧草对体外发酵 pH 和 NH_3-N 浓度的影响

瘤胃 pH 是评价瘤胃内环境的重要指标之一，维持瘤胃正常 pH 是保证瘤胃正常发酵的前提，而正常奶牛瘤胃液 pH 的正常范围为 5.5~7.5[40]，在本试验中，5 种发酵底物体外发酵液 pH 范围为 6.32~6.59，均在正常范围内。已有报道指出，当 pH 大于 5.7 时，瘤胃微生物具有最大生长速度[41]，由此可知，本试验中粗饲料体外发酵均有利于微生物的生长。瘤胃 pH 的大小受反刍动物唾液分泌，有机酸的生成、吸收和排出等多种因素影响，但其波动的根本原因在于饲粮结构[42]，本试验中，牧草以苇状羊茅体外发酵液中 pH 最低，可能是由于发酵产生较高的 VFA 所造成的。牧草体外发酵液 pH 大小与各粗饲料对应体外发酵 VFA 总

量基本保持一致。

瘤胃中 NH_3-N 是瘤胃微生物合成微生物蛋白和机体蛋白的主要原料，也是微生物生长的重要氮源，其浓度在一定程度上可以反应出瘤胃中蛋白质降解与合成之间的平衡状态[43]。Suwanlee 等[44]研究指出，瘤胃中 NH_3-N 的最佳浓度范围为 6.2~27.5 mg/dL，而在本试验中，5 种发酵底物体外发酵液中 NH_3-N 浓度范围为 6.26~19.74 mg/dL，均在所报道的最佳浓度范围内。同时，牧草之间体外 NH_3-N 浓度均存在显著差异，这种差异可能是由于不同牧草蛋白质含量不同所造成的。其中，牧草以紫花苜蓿体外 NH_3-N 浓度最高，且显著高于其他牧草，这可能是由于紫花苜蓿为豆科植物，其他牧草为禾本科植物造成的。已有报道指出豆科植物的蛋白质含量大于禾本科植物的蛋白质含量[6]，由此可知，豆科的紫花苜蓿的蛋白质含量高于禾本科的其他牧草，因此体外发酵 NH_3-N 浓度高于其他牧草。

3.5 不同牧草对体外发酵 VFA 产量的影响

VFA 主要是由瘤胃微生物对饲料营养物质进行厌氧发酵而得到的终产物[45]，是反刍动物赖以生存、保持正常生长、泌乳和繁殖的主要能源，可提供反刍动物总能量需要的 70%~80%，因而在反刍动物碳水化合物营养中占有重要地位[46]。VFA 的种类主要有乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异丁酸、异戊酸等，而对动物代谢最为重要的是乙酸、丙酸、丁酸，三者约占瘤胃 VFA 总量的 95%，其中又以乙酸是产量最大的 VFA，喂粗料饲粮时占 VFA 总产量的 70%-75%[47]。

在本试验中，不同牧草体外 VFA 产量及其组成均存在明显差异，牧草中苇状羊茅体外乙酸、丙酸、丁酸以及总 VFA 的产量均显著高于其他牧草，但乙酸/丙酸却相对较低；芦苇体外总 VFA 含量相对较低，但其乙酸/丙酸相对较高，这种差异可能是由不同牧草所含可发酵有机物以及 NDF 含量不同所引起的。郭冬生等[47]研究报道，VFA 的生成量主要取决于可发酵有机物，李旺[48]研究报道，饲料中矿物元素也会影响到 VFA 的产量，同时指出 VFA 的组成受饲料中 NDF 和非 NDF 的影响较大。此外，不同来源植物细胞壁体外发酵 VFA 产量

也存在显著差异；张元庆等[49]研究报道 6 种不同来源植物细胞壁发酵产生总 VFA 含量及其除丁酸含量外的其他 VFA 组分均存在显著性差异。

4 结 论

①体外发酵 48 h 后，苇状羊茅体外产气量、V_f、FRD_0、IVDMD 及 CH_4、乙酸、丙酸、丁酸、总 VFA 产量均显著高于其他 4 种牧草。

②体外发酵 48 h 后，苇状羊茅体外发酵 pH 及乙酸/丙酸显著低于其他试验牧草，紫花苜蓿体外 NH_3-N 浓度最高，为 18.64 mg/dL，显著高于其他试验牧草。

③综合不同牧草体外产气参数、体外发酵指标和降解率发现，以苇状羊茅体外发酵效果最佳，与其他试验牧草相比，更容易被瘤胃微生物降解利用。

致谢：感谢南京农业大学草业学院邵涛教授为本试验提供牧草试验材料。

参考文献:

[1] 呼天明,边巴卓玛,曹中华,等.施行草地农业推进西藏畜牧业的可持续发展[J].家畜生态学报,2005,26(1):78-80.

[2] 边巴卓玛,呼天明,吴红新.依靠西藏野生牧草种质资源提高天然草场的植被恢复效率[J].草业科学,2006,23(2):6-8.

[3] 姜文清,周志宇,秦彧,等.西藏牧草和作物秸秆热值研究[J].草业科学,2010,27(07):147-153.

[4] 赵禹臣,孟庆翔,参木有,等.西藏高寒草地冷暖季牧草的营养价值和养分提供量分析[J].动物营养学报,2012,24(12):2515-2522.

[5] 曲广鹏,袁庆华,参木友.西藏农区牧草饲草作物引种试验研究[D].硕士毕业论文.北京:中国农业科学院,2012:17.

[6] 张中岳.西藏地区牧草营养价值及其瘤胃降解特性研究[M].硕士学位论文,西安:西北农林科技大学,2009.

[7] 张吉,原现军,郭刚,等.添加剂对西藏燕麦和箭筈豌豆混合青贮发酵品质的影响[J].草业学

报,2014,23(5):359-364.

[8] 孙肖慧,原现军,郭刚,等.添加乙醇和糖蜜对西藏地区燕麦和紫花苜蓿混合青贮发酵品质的影响[J].畜牧兽医学报,2014,45(3):417-425.

[9] 李君风,孙肖慧,原现军,等.添加乙酸对西藏燕麦和紫花苜蓿混合青贮发酵品质和有氧稳定性的影响[J].草业学报,2014,23(5):271-278.

[10] 赵庆杰,原现军,郭刚,等.添加糖蜜和乳酸菌制剂对西藏青稞秸秆和多年生黑麦草混合青贮发酵品质的影响[J].草业学报,2014,23(4):100-106.

[11] 原现军.西藏地区农作物秸轩与牧草混合青贮研究[D].博士学位论文.南京:南京农业大学,2012:127.

[12] National Research Council.Subcommittee on dairy cattle nutrition.Nutrient requirements of dairy cattle[M].Washington D.C.:National Academies Press,2001.

[13] HALL M B,PELL A N,CHASE L E.Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes[J].Animal Feed Science and Technology,1998,70(1/2):23-39.

[14] 杨胜.饲料分析及饲料质量检测技术[M].北京:北京农业大学出版社,1993:58-64.

[15] 冯三令,储瑞武,吴玲,等.ICP-AES 法测定饲料中多种微量元素的方法研究[J].畜牧与饲料科学,2010,31(4):109-112.

[16] 刘玉杰,李向林,何峰.基于饲养标准的家畜单位折算方法[J].草地学报,2009,17(4):500-504.

[17] MENKE K H,STEINGASS H.Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid[J].Animal Research and Development,1988,28(7):55.

[18] 王祚,周传社,汤少勋,等.两种酵母对奶牛瘤胃体外发酵特性的影响[J].农业现代化研究,2014,35(2):218-224.

[19] WANG M,TANG S X,Tan Z L.Modeling *in vitro* gas production kinetics: derivation of logistic-exponential (LE) equations and comparison of models[J].Animal Feed Science and Technology,2011,165:137–150.

[20] WANG M,JANSSEN P H,SUN X Z,et al.A mathematical model to describe *in vitro* kinetics of H_2 gas accumulation[J].Animal Feed Science and Technology,2013,184:1–16.

[21] LI X Z,LONG R J,YAN C G,et al.Rumen microbial responses in fermentation characteristics and production of CLA and methane to linoleic acid in associated with malate or fumarate[J].Animal Feed Science and Technology,2010,155(2-4):132-139.

[22] 冯宗慈,高民.通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J].畜牧与饲料科学,2010,31(6–7):37.

[23] WANG M,SUN X Z,JANSSEN P H,et al.Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in *in vitro* ruminal cultures[J].Animal Feed Science and Technology,2014,194:1-11.

[24] 汤少勋,姜海林,周传社,等.不同牧草品种对体外发酵产气特性的影响[J].草业学报.2005,14(3):72-77.

[25] CONE J W,GELDE VAN A H.Influence of protein fermentation on gas production profiles[J]. Animal Feed Science and Technology,1999,76:251-264.

[26] 刘书杰.利用体外产气法评定青海高原天然牧草营养价值的研究[D].硕士学位论文.西宁:青海大学,2007:13.

[27] METZLER-ZEBELI B U,SCHERR C,SALLAKU E,et al.Evaluation of associative effects of total mixed ration for dairy cattle using *in vitro* gas production and different rumen inocula[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2012,92(12):2479–2485.

[28] 高巍,王新峰,潘晓亮,等.玉米秸青贮与黄贮及苜蓿干草的体外发酵动态消化研究[J].石河子大学学报：自然科学版,2002,6(3):222-225.

[29] WANG M,SUN X Z,TANG S X,et al.Deriving fractional rate of degradation of logistic-exponential (LE) model to evaluate early *in vitro* fermentation[J]. Animal,2013,7(6):1-10.

[30] MUCK R E, FILYA I, CONTRERAS-GOVEA F E.Contreras-Govea F E. Inoculant effects on alfalfa silage: *in vitro* gas and volatile fatty acid production[J].Journal of Dairy Science,2007,90(11):5115–5125.

[31] 郭嫣秋,胡伟莲,刘建新.瘤胃甲烷菌及甲烷生成的调控[J].微生物学报,2005,45(1):145-148.

[32] JOHNSON K A, JOHNSON D E.Methane emissions from cattle[J].Animal Science,1995,73:2483-2492.

[33] 郭雪峰,金海,卢德勋,等.甲烷气体产生量与牧草营养参数的相关性分析[J].江西农业大学学报,2009,31(1):35-40.

[34] 刘树军,李向林,何峰,等.奶牛常用饲草的体外发酵 CH_4 产量研究[J].草地学报,2011,19(5):858-864.

[35] MOSS A R,GIVENS D I.The effect of alkali treatment of cereal straws on the digestibility and methane production by sheep[J]. Animal Feed Science and Technology,1994,49:245-259.

[36] HOLTER J B,YOUNG A J.Methane prediction in dry and lactating Holstein cows[J].Journal of Dairy Science,1992,75(8):2165-2175.

[37] MILLER T L,WOLIN M J. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxylmethylglutaryl-ScoA reductase inhibitors[J].Journal of Dairy Science,2001,84:1445-1448.

[38] FERNANDO W M,FLINT S,BRENNAN C S,et al.The influence of environmental factors on the adhesion of combinations of probiotics to rice fibre fractions[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2012,28(6):2293-2302.

[39] 徐俊,侯玉洁,赵国琦,等.瘤胃微生物对苜蓿茎降解特性及超微结构的影响[J].动物营养学报,2014,26(3) :776-782.

[40] MARIE K K,OETZEL G R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review[J].Animal Feed Science and Technology,2006,126(3):215-255.

[41] VAN HOUTERT M F J.The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: a review[J].Animal Feed Science and Technology,1993,43(3):189-255.

[42] XU S,HARRSION J H, CHALUPA W,et al.The effect of ruminal bypass lysine and methionine on milk yield and composition of lactating cows[J].Journal of Dairy Science,1998,81(4):1062-1077.

[43] FIRKINS J L,YU Z, MORRISON M R.Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for intergration of microbiology and nutrition for dairy[J].Journal of Dairy Science,2007,90(1):1-6.

[44] SUWANLEE S, WANAPAT M.Effect of ruminal NH_3-N levels on ruminal fermentation, purine derivatives, digestibility and rice straw intake in Swamp Buffaloes[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Science,1999,12(6):904-907.

[45] BERGMAN E N.Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen[J]. Biochemistry Journal,1965,97:53-58.

[46] 王中华,反刍动物挥发性脂肪酸中间代谢[J],草食家畜,1995,2:23-33

[47] 郭冬生,彭小兰.反刍动物挥发性脂肪酸消化代谢规律刍议[J],畜牧与饲料科学,2005,1:1-3.

[48] 李旺.瘤胃挥发性脂肪酸的作用及影响因素[J].中国畜牧杂志,2012,48(7):63-66.

[49] 张元庆,魏吉安,孟庆翔.不同植物细胞壁的体外发酵特征及其对甲烷产生的贡献[J].畜牧兽医学报,2006,37(10),992-998.

Study on *in vitro* Fermentation Characteristics of Different Pastures in Tibet

LI Bin[1] CHEN Liang[2*] BASANG Zhuza[1] AO Siman[1] ZHOU Chuanshe[2**]

（1. *Institute of Animal Science of Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa* 850000, *China*; 2. *Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Substropical Region, Hunan Research Center of Livestock & Poultry Science, South-Central Experimental Station of Animal Nutrition and Feed Science in Ministry of Agriculture, Institute of Substropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha* 410125, *China*; 3. *Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety, Changsha* 410128, *China*）

Abstract: The article aims to assess the nutritional value of different pastures in Tibet using *in vitro* gas production technique. Five kinds of common pasture were selected in Tibet, the cumulative gas production after 48 h fermentation (V), the theoretical maximum gas production (V_f), the initial fractional rate of degradation (FRD_0), the elapsed time until half of the maximum gas production ($t_{0.5}$), *in vitro* dry matter disappearance (IVDMD), *in vitro* neutral detergent fiber disappearance (IVNDFD), pH, ammoniacal nitrogen (NH_3-N) concentration and volatile fatty acid (VFA) production were determined using *in vitro* gas production technique by the single factor experimental design. The results showed that after 48 h fermentation *in vitro*, the V, V_f, FRD_0, $t_{0.5}$, IVDMD and methane (CH_4), acetic acid, propionic acid, butyric acid and the total VFA production of tall fescue were significantly higher than those of the other four kinds of pastures (P<0.05), while the *in vitro* fermentation pH and the ratio of acetic acid to propionic acid were significantly lower than that of the other four kinds of pastures (P<0.05). The NH_3-N concentration of alfalfa

was the highest and it was significantly higher than that of the other four kinds of pastures (P<0.05). The results demonstrated that tall fescue possesses the best *in vitro* fermentation effect and it is more easily to be utilized by the rumen microorganisms compared to the other pastures.

Keywords: Tibet; pasture; *in vitro* fermentation

---

*Contributed equally
**Corresponding author, professor, E-mail: zcs@isa.ac.cn (责任编辑　武海龙)